

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : 2 667 072

(à utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d' enregistrement national : 90 11746

(51) Int Cl⁵ : C 08 B 37/08; C 07 F 9/10; C 07 C 53/126,
57/03//A 61 K 9/127

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 24.09.90.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : BIOETICA Société anonyme — FR.

(72) Inventeur(s) : Domard Alain et Demarger Sandrine.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 27.03.92 Bulletin 92/13.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Beau de Loménie.

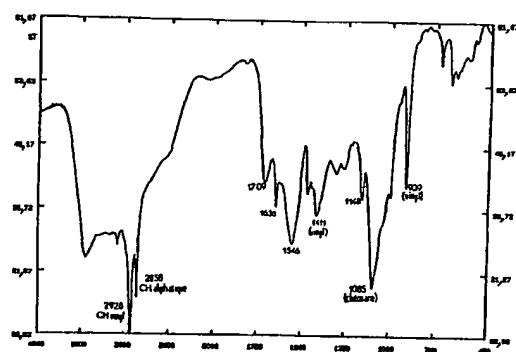
(54) Complexé ternaire de chitosane, d'ions calcium et de lipides, procédé de préparation et leurs applications.

(57) L'invention concerne un complexe ternaire stable de chitosane, de lipide et de calcium.

Le lipide peut être sous forme de sel monovalent de métal alcalin, de préférence le sodium.

Ce complexe peut être utilisé pour stabiliser des dispersions aqueuses de liposomes.

Ce complexe peut présenter un spectre infrarouge, tel qu'observé à la figure 2.



Spectre I.R. du complexe obtenu par addition de $5 \cdot 10^{-4}$ M chitosane dans une solution contenant $1 \cdot 10^{-3}$ M undécylénate de Na et $1 \cdot 10^{-3}$ M CaCl_2

FR 2 667 072 - A1



Complexe ternaire de chitosane, d'ions calcium et de lipides, procédé de préparation et leurs applications.

La présente invention concerne essentiellement des complexes ternaires de chitosane, d'ions calcium, et de lipides, leur procédé de préparation et leurs applications.

On sait que le chitosane est un polysaccharide obtenu par N-désacétylation de la chitine, constituant important des exosquelettes de tous les arthropodes.

Le chitosane a déjà été utilisé comme biomatériau offrant de nombreuses applications dans les domaines de la médecine, de la pharmacie ou de l'agroalimentaire.

Dans le domaine médical, ces propriétés de biodégradabilité, de non-toxicité, d'hémostatique local, de non-antigénicité, etc., lui ont donné des débouchés dans des applications de cicatrisation et de culture cellulaire comme décrit dans R.A.A. Mazzarelli, G. Biagini, A. Pugnaloni, O. Filippini, V. Baldassarre, "Reconstruction of periodontal tissue with chitosan", Biomaterials, 1989, 20, 598-603.

Ces propriétés hypocholestérolémiantes ont été démontrées chez le rat, en application alimentaire, comme décrit dans M. Sugano, T. Fujikawa, V. Hiratsuki, Y. Hasegawa. "Hypocholesterolemic effects of chitosan in cholesterol-fed rats". Nutrition reports international, 1979, 19, 327-34.

Egalement, ces propriétés biostimulantes et bioprotectrices ont été révélées dans le domaine agricole comme décrit dans R.E. Lewis, "Treatment of plants with salts of chitosan", International Patent, WO89/07395, ou de manière plus générale en biologie végétale comme décrit dans H. Hauss, W. Jeblick and A. Domard, "The degree of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *catharanthus roseus*". Planta, 1989, 178, 385-92.

On sait également que les lipides et les ions calcium jouent un rôle dans la plupart des mécanismes biologiques, que ce soit dans le domaine animal ou végétal.

La présente invention est basée sur la découverte inattendue qu'il était possible de préparer des complexes ternaires stables de chitosane, de lipides et d'ions calcium et que ces complexes ternaires stables présentaient un effet de synergie permettant d'aboutir lorsque cela est désiré à une maîtrise partielle ou complète du contrôle des mécanismes biologiques essentiels.

La présente invention a donc pour objet principal de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de régler la teneur d'un milieu en ions calcium, en lipides ou en chitosane d'une manière indépendante ou simultanée.

La présente invention a encore pour but de résoudre ce nouveau problème technique d'une manière simple, fiable et reproductible en permettant ainsi d'utiliser la solution proposée dans un nombre considérable d'applications, en particulier l'épuration des eaux usées, l'agriculture, l'industrie agroalimentaire, la diététique, notamment par le biais de régimes hypolipidiques, la cosmétologie, notamment par des préparations amincissantes externes en application cutanée, la médecine, notamment pour le traitement de certaines lésions.

La présente invention a encore pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de soustraire ou d'apporter à un milieu de manière indépendante ou simultanée le chitosane, un lipide ou du calcium.

Tous ces problèmes techniques sont résolus pour la première fois par la présente invention d'une manière satisfaisante, simple, fiable et reproductible, en étant ainsi utilisable à l'échelle industrielle.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention fournit un complexe ternaire stable de chitosane, de lipide et de calcium.

Selon un mode de réalisation particulier, ce complexe ternaire est caractérisé en ce que le Lipide est sous forme de sel monovalent de métal alcalin, de préférence un sel de sodium.

Selon une autre variante de réalisation, ce complexe ternaire est caractérisé en ce que le Lipide est formé par un acide

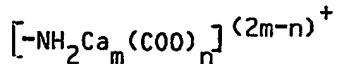
gras saturé ou insaturé, en particulier en phospholipide tel que la lécithine.

05 Selon un autre mode de réalisation particulier, ce complexe ternaire est caractérisé en ce qu'il est sous forme d'un complexe polynucléaire dans lequel le nombre d'atomes de calcium par rapport au nombre de molécules de chitosane ou de lipide est supérieur à 1, et en particulier compris entre plus de 1 et 4.

10 Selon encore un autre mode de réalisation particulier, le complexe ternaire présente un rapport molaire Lipide/ion calcium/chitosane de 1/1/1 ; ou 2/1/1 ou 3/1/1.

15 On peut observer que le complexe ternaire selon l'invention est stable et se forme entre les fonctions $-NH_2$ des motifs glucosamine du chitosane, les ions calcium et les sites anioniques des lipides, c'est-à-dire soit les fonctions carboxylate $-COO^-$ et/ou phosphate dans le cas de phospholipides du type $P-O^-$.

On peut donner, sans limitation, la formule du complexe comme suit :



20 dans laquelle $-NH_2$ symbolise une fonction amine du chitosane et COO symbolise une fonction acide du lipide.

25 Ce complexe ternaire peut être défini comme étant de deux types, soit de type mononucléaire lorsque $m = 1$ (un seul ion calcium), avec n variant de 1 à 7 en particulier de 1 à 3, et des complexes polynucléaires où m est supérieur à 1, en particulier est plus grand que 1 et inférieur à 10, encore mieux entre 4 et 10.

30 Selon une autre caractéristique particulière du complexe ternaire, celui-ci est caractérisé en ce que le chitosane présente un degré d'acétylation inférieur à 30 %, encore de préférence présente un taux d'acétylation résiduel inférieur à 0,5 % en étant ainsi essentiellement totalement désacétylé.

Selon une autre caractéristique particulièrement avantageuse de l'invention, le chitosane présente une masse moléculaire allant de la masse moléculaire de l'oligomère à des polymères présentant une masse moléculaire supérieure à 5 000.

35 Par ailleurs, selon une autre caractéristique particulière de l'invention, les ions calcium sont apportés par tout sel

de calcium soluble dans l'eau au pH utilisé. L'anion associé à l'ion calcium dépendra naturellement de l'application choisie et pourra être en particulier un chlorure. Tout autre anion peut être utilisé dans la mesure où il n'interfère pas avec la formation du complexe ternaire recherché.

Selon un second aspect, la présente invention fournit également un procédé de préparation d'un complexe ternaire stable de chitosane, de lipide et de calcium, caractérisé en ce qu'on met en présence le chitosane, ledit lipide sous forme de sel monovalent de métal alcalin et des ions calcium. En particulier, cette mise en présence est réalisée par dissolution ou mise en suspension dans une solution aqueuse, en particulier à un pH compris entre 5,5 et 6,5 environ.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé, la mise en présence précitée comprend l'introduction du chitosane sous forme amine libre en particulier à l'état solide, dans une solution contenant des ions calcium et le lipide sous forme de sel monovalent.

Selon un autre mode de réalisation particulier du procédé, la mise en présence précitée comprend tout d'abord la formation d'une solution liposomale des lipides précités, puis l'ajout dans cette solution de l'ion calcium, puis l'ajout de chitosane soit sous forme solide en suspension, soit sous forme dissoute dans une solution aqueuse.

Selon un autre mode de réalisation particulier du procédé, la mise en présence précitée comprend tout d'abord la mise en solution du chitosane dans une solution aqueuse dont le pH est compris entre 5,5 et 6,5 environ, dans laquelle on ajoute ensuite des ions calcium, en particulier en concentration voisine de celle en résidu glucosamine du chitosane, puis enfin on ajoute une solution du lipide précité sous forme de sel monovalent.

Selon une variante de réalisation particulière du procédé, on augmente progressivement la quantité de lipide ajouté pour une même concentration initiale en calcium.

Selon une autre variante de réalisation particulière du procédé, le rapport initial en ions calcium par rapport au nombre

de groupes NH₂ du chitosane est élevé, en étant au moins égal à 4 et de préférence compris entre 4 et 10, en formant ainsi des complexes polynucléaires obtenus avec au moins 4 ions calcium pour un groupe NH₂ du chitosane et 1 mole de Lipide.

05 Selon un troisième aspect, la présente invention fournit également un procédé de stabilisation de dispersion aqueuse de liposome, caractérisé en ce qu'on forme un complexe ternaire stable par addition dans ladite suspension de liposome, de chitosane et d'ions calcium de manière à former un complexe ternaire stable de 10 chitosane, de calcium avec des lipides constituant les liposomes.

15 Selon ce troisième aspect, on pourra stabiliser les liposomes dans le cadre de la cosmétologie, de la pharmacie, les liposomes encapsulant alors des principes actifs, la médecine dans les applications médicales où le liposome joue un rôle important seul ou par les principes actifs qui le renferment, ainsi que dans le cadre de l'agriculture où la stabilisation de liposome seul ou encapsulant un principe actif utilisé comme biostimulant ou bio-protecteur.

20 Egalement, selon un quatrième aspect, la présente invention concerne l'utilisation du complexe ternaire stable précité comme réserve individuelle ou simultanée de chitosane, lipide, calcium, en particulier pour réguler les flux de calcium ou les échanger à la surface d'un milieu, comme biomatériau ou en implant créant une bioactivité.

25 Dans ce cas, les débouchés sont la cosmétologie, en particulier des préparations épidermiques biostimulantes régénératrices, la médecine, en particulier en cicatrisation comme milieu de culture favorable à la multiplication cellulaire, en implantologie comme biomatériau en tant que tel ou en association à la 30 surface d'un implant pour créer la bioactivité, en particulier une bioadhésion.

35 La présente invention concerne encore selon un cinquième aspect un procédé de contrôle de la teneur individuelle ou simultanée en chitosane, lipide ou calcium d'un milieu biologique, caractérisé en ce qu'il comprend la formation in situ du complexe

ternaire stable précité par rapport *in situ* de l'un ou des autres constituants du complexe ternaire autre que le constituant dont la teneur est à contrôler.

05 Ainsi, si l'on veut contrôler la teneur en lipide d'un milieu, en particulier en éliminant le lipide présent dans le milieu, on procède alors à l'apport d'ions calcium et de chitosane pour former le complexe ternaire stable précité qui se sépare pour précipitation dans le cas où c'est le calcium qui doit être contrôlé notamment en étant partiellement ou totalement éliminé, on procède à un apport de lipide et de chitosane pour former le complexe ternaire stable précité. Il est encore possible, par exemple, de contrôler la teneur simultanée en lipide et en calcium, en particulier pour éliminer chacun de ces deux éléments du milieu, en apportant du chitosane seul en quantité suffisante pour former le complexe ternaire stable précité. Toutes les variantes possibles sont naturellement clairement appréhendées par l'homme de l'art et font partie intégrante de la présente invention.

20 Ce procédé peut être applicable dans de nombreux domaines, en particulier dans le cadre de la diététique ou dans le cadre de régimes hypolipidiques, dans le cadre de la cosmétologie pour des préparations amincissantes externes en application cutanée, dans le cadre de la médecine pour le traitement de certaines lésions, dans le cadre de l'épuration des eaux usées pour éliminer des lipides dans les effluents industriels comme ceux concernant le domaine alimentaire, dans le cadre de l'agriculture pour la protection des végétaux, semences, racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits, ou dans le cadre de biostimulant favorisant les facteurs de croissance.

25 30 On peut encore citer les biotechnologies où l'emploi du complexe ternaire stable de l'invention est intéressant comme milieu de culture cellulaire animale ou végétale, ou dans l'agriculture dans le cadre de l'amendement des sols.

35 Le complexe ternaire selon l'invention présente une grande stabilité qui lui permet de supporter une température au moins égal à 45°C, ce qui permet de préparer des compositions cosmétiques ou pharmaceutiques pour lesquelles il est exigé une

stabilité à une température au moins égale à 45⁰C.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à l'homme de l'art à partir de la description explicative qui va suivre faite en référence à plusieurs exemples de préparation donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention. Ces exemples sont donnés en référence à plusieurs figures représentant des spectres infrarouges obtenus comme suit :

10 - la figure 1 représente le spectre infrarouge du chitosane totalement désacétylé ;

15 - la figure 2 représente le spectre infrarouge du complexe obtenu par addition de 5.10⁻⁴ M chitosane dans une solution contenant 1.10⁻³ M d'undécylénate de sodium et 1.10⁻³ M de chlorure de calcium ;

20 - la figure 3 représente un spectre infrarouge d'un film de chitosane après 13 jours de trempage dans une solution d'undécylénate de sodium 1.10⁻³ M contenant 1.10⁻³ M de chlorure de calcium ; et

25 - la figure 4 représente un spectre infrarouge d'un film de chitosane après 9 jours de trempage dans une suspension de liposome de lécithine (10 mg/mL) contenant 1.10⁻³ M de chlorure de calcium.

Exemple I : Préparation de complexes ternaires chitosane, ions calcium, acide gras en solution

I-A : Préparation des solutions de chitosane

On part de chitosanes produits en France par la société Aber Technologies. Les différents lots sont purifiés de la façon suivante : 4,8 g sont dispensés sous agitation dans 1 L d'eau distillée (ou déconisée), on ajoute 1,8 g d'acide acétique et la dissolution est atteinte au bout de 1 h. On filtre sous pression sur membrane Millipore jusqu'à 0,22 µm. La solution parfaitement limpide obtenue est alors précipitée par de l'ammoniaque diluée, à pH 8. Elle est ensuite centrifugée et lavée trois fois de suite, le culot est disposé dans le minimum d'eau et lyophilisé (alternative-

ment il peut être lavé à l'alcool, filtré et séché sous vide à l'étuve à 50°C. Le solide obtenu est alors caractérisé vis-à-vis de son taux d'acétylation résiduel par spectroscopie I.R. et de sa masse moléculaire par viscosimétrie (A. Domard and M. Rinauds, 05 "Preparation and characterization of Forlly deacetylated chitosan". Int. J. Biol. Macromol, 1987, 5, 49-52).

Les chitosanes purifiés peuvent être désacétylés totalement selon la méthode décrite par A. DOMARD et coll (A. Domard and M. Rinauds, "Preparation and characterization of Forlly 10 deacetylated chitosan". Int. J. Biol. Macromol, 1987, 5, 49-52), on prépare ainsi des poly(glucosamine) de degré d'acétylation pouvant aller jusqu'à 6 000.

Les chitosanes totalement désacétylés sont, pour certaines applications, hydrolysés selon la méthode proposée par 15 A. DOMARD et coll. (A. Domard and N. Cartier, "Glucosamine oligomers : 1. Préparation and characterization". Int. J. Biol. Macromol., 1989, 11, 297-302).

Dans tous les cas, on prépare des solutions mères à concentration égale à 9×10^{-2} éq/l en dissolvant 0,162 g de chitosane 20 dans 20 mL d'acide chlorhydrique 0,05 M.

I-B : Préparation de solutions d'acide gras

Exemple : acide undécylnique

L'acide undécylnique sous forme de sel de sodium est 25 utilisé sans purification supplémentaire (pureté 98 %). On prépare une solution mère d'undécylnate de sodium à la concentration de 5×10^{-2} éq/l en plaçant 0,2063 g d'undécylnate de sodium dans 20 mL d'eau. La concentration est vérifiée par dosage et éventuellement ajustée.

30

I-C : Préparation de solutions de chlorure de calcium

On prépare des solutions mères 10^{-3} M en dissolvant du chlorure de calcium anhydre dans la quantité nécessaire d'eau.

I-D : Mélange des produits

- i. Si l'on part d'une solution de chitosane 5×10^{-4} éq/l portée à pH environ 5,5 contenant 5×10^{-4} éq/l de CaCl_2 , on forme préférentiellement le complexe 1/1/1 pour les concentrations en undécylénate de sodium ajoutées inférieures à 1×10^{-4} M. Le complexe 2/1/1 est principalement formé pour les additions en undécylénate correspondant aux concentrations comprises entre $1,5 \times 10^{-4}$ et 2×10^{-4} M. Le complexe 3/1/1 est enfin formé préférentiellement au-delà des concentrations correspondant à $2,5 \times 10^{-4}$ M.
- ii. Si l'on part maintenant d'une solution de chitosane 5×10^{-4} éq/l contenant 1×10^{-3} mole/l de chlorure de calcium, on forme préférentiellement le complexe 1/1/1 jusqu'à une concentration d'undécylénate ajouté de 5×10^{-4} M.
- iii. Si l'on part d'une solution de chitosane 5×10^{-4} éq/l contenant 5×10^{-3} mole/l de chlorure de calcium, on forme préférentiellement des complexes polynucléaires en calcium.
- iv. Si l'on part d'une solution d'undécylénate de sodium 1×10^{-3} M contenant 1×10^{-3} mole/l de chlorure de calcium on forme, dès la première addition de chitosane, un précipité correspondant à une association ternaire contenant de moins en moins de calcium par fonction NH_2 . Si l'on se place dans les conditions où l'on a ajouté une fonction amine pour deux lipides et qu'on abandonne la solution pendant deux jours, le produit ayant précipité est filtré et caractérisé (après lavage à l'eau distillée) par microanalyse. On montre (tableau I) que dans ce cas la complexation a été suivie d'une adsorption de lipides supplémentaire sur le précipité et qu'il est possible ainsi de soustraire les lipides du milieu dès que le processus de complexation ternaire est amorcé, alors qu'aucune interaction lipide chitosane n'est obtenue en l'absence de calcium. Une autre caractérisation est obtenue par spectroscopie IR (figure 2). Le complexe ternaire se manifeste par la présence de trois types de bandes : celles que l'on peut considérer comme typiques du Lipide (à $2928, 1638, 1411$ et 909 cm^{-1}), du chitosane (à $3960, 1148$ et 1085 cm^{-1}) et celles nouvelles liées à la formation du complexe (1709 et 1546 cm^{-1}).

iiiii. Une autre possibilité de former le complexe ternaire consiste à partir d'un mélange 5×10^{-4} M d'undécylénate de sodium et 5×10^{-4} éq/l de chitosane auquel on ajoute du chlorure de calcium.

05

Exemple II : Préparation de complexe ternaire chitosane, ion calcium, acide gras en partant de chitosane solide

Préparation d'un film de chitosane

10

Un film de chitosane est préparé en dissolvant 15 mg de chitosane totalement désacétylé dans 1,2 ml d'acide acétique dilué à 1 %. Le film est formé par évaporation, à l'étuve à vide à 70°C , de la solution étalée sur une plaque de verre. Il est ensuite détaché par immersion dans un bain ammoniacal dilué et d'alcool méthylique, puis séché sous vide à 70°C .

15

Formation du complexe

20

Les films sont immersés sous agitation lente, dans 20 ml de solution d'undécylénate de sodium 1×10^{-3} M contenant du chlorure de calcium 1×10^{-3} M. Le complexe ternaire s'établit progressivement au cours du temps. Il peut être aisément caractérisé par spectroscopie IR (figure 3) après lavage du film à pH 7 et séchage. Comme dans l'exemple précédent, on retrouve les bandes caractéristiques du chitosane (à 3960, 1582, 1148 et 1085 cm^{-1}) du lipide (à 25 2930 et 1640 cm^{-1}) et les nouvelles liées à la formation du complexe (à 1560 cm^{-1} en particulier).

25

30

Dans tous les cas des exemples I et II, les complexes ternaires sont formés dans des solutions contenant du chlorure de sodium 0,3 M pour maintenir une force ionique constante facilitant les mesures de concentration en ions calcium libres, force ionique qui a priori ne joue aucun rôle sur la stabilité des complexes.

Exemple III : Préparation de complexes ternaires chitosane, ions calcium, liposomes à partir de solutions de chitosane

III-A Préparation de liposomes de lécithine

05 On évapore une solution contenant 100 mg de lécithine dans 10 ml d'un mélange chloroforme éthanol (1/1) à l'aide d'un évaporateur rotatif, sous vide, à 40-50°C. Le film obtenu est dispersé dans 10 ml d'eau. Cette suspension est soumise à sonication grâce à une microsonde à ultrasons (25 W pendant 20 min). Le 10 liquide apparaît alors limpide. Il est centrifugé 45 min à environ 10⁵ G. Le surnageant contient des vésicules unilamellaires (SUV) dont la forme et les dimensions sont contrôlées par microscopie électronique à transmission.

15 III-B Formation du complexe ternaire

Si l'on ajoute une solution de chitosane (5×10^{-2} éq/L) à une suspension diluée de SUV de lécithine (environ 7 mg dans 40 ml) placée à pH 5,5 il se forme une interaction ternaire chitosane, calcium, liposomes. Pour des pH initiaux supérieurs pouvant 20 aller jusqu'à 6,1, l'interaction est plus efficace. Le même type d'interaction est aussi obtenu avec des liposomes multilamellaires.

Exemple IV : Préparation de complexes ternaires chitosane, ions calcium, liposomes à partir de chitosane solide

25 Les liposomes sont préparés comme dans l'exemple III et les films de chitosane comme dans l'exemple II. Un film de chitosane est trempé dans 10 ml d'une suspension de liposomes de lécithine (10 mg de lécithine/ml) placée à pH 5,5 et à 37°C en présence de chlorure de calcium 0,05 M. La solution de liposome peut être renouvelée régulièrement en fin de cycle, le film est lavé à l'eau 30 à pH 7, puis séché sous vide. Le complexe est caractérisé par spectroscopie I.R. (figure 4). Les bandes du chitosane sont les mêmes que dans l'exemple III, celles du lipide (essentiellement à 2930 cm⁻¹) et les nouvelles typiques du complexe à 1620 et 35 1535 cm⁻¹.

12

Dans tous les cas, les mélanges sont opérés en présence de chlorure de sodium 0,3 M qui n'influence pas la stabilité du complexe.

05

10

15

20

25

30

35

REVENDICATIONS

1. Complexe ternaire stable de chitosane, de Lipide et de calcium.
- 05 2. Complexe ternaire selon la revendication 1, caractérisé en ce que le Lipide est sous forme de sel monovalent de métal alcalin, de préférence le sodium.
- 10 3. Complexe ternaire selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le Lipide est formé par un acide gras saturé ou insaturé, en particulier un phospholipide tel que la Lécithine.
- 15 4. Complexe ternaire selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est sous forme d'un complexe poly-nucléaire dans lequel le nombre d'atomes de calcium par rapport au nombre de molécules de chitosane ou de Lipide est supérieur à 1 et inférieur à 10.
5. Complexe ternaire selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le rapport molaire Lipide/ion calcium/chitosane est de 1/1/1 ; ou 2/1/1 ou 3/1/1.
- 20 6. Procédé de préparation d'un complexe ternaire stable de chitosane, de Lipide et de calcium, caractérisé en ce qu'on met en présence le chitosane, ledit Lipide sous forme de sel monovalent de métal alcalin et des ions calcium.
- 25 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la mise en présence précitée est réalisée par dissolution ou mise en suspension dans une solution aqueuse, en particulier à un pH compris entre 5,5 et 6,5 environ.
- 30 8. Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que la mise en présence précitée comprend l'introduction du chitosane sous forme amine libre en particulier à l'état solide, dans une solution contenant des ions calcium et le Lipide sous forme de sel monovalent.
- 35 9. Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que la mise en présence précitée comprend tout d'abord la formation d'une solution liposomale des Lipides précités, puis l'ajout dans cette solution d'ions calcium, puis l'ajout de chitosane soit

sous forme solide en suspension, soit sous forme dissoute dans une solution aqueuse.

10. Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que la mise en présence précitée comprend tout d'abord la mise
05 en solution du chitosane dans une solution aqueuse dont le pH est compris entre 5,5 et 6,5 environ, dans laquelle on ajoute ensuite des ions calcium, en particulier en concentration voisine de celle en résidu glucosamine du chitosane, puis enfin on ajoute une solution du Lipide précité sous forme de sel monovalent.

10 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'on augmente progressivement la quantité de Lipide ajouté pour une même concentration initiale en calcium.

15 12. Procédé selon l'une des revendications 6 à 10, caractérisé en ce que le rapport initial en ion calcium par rapport au nombre de groupes NH_2 du chitosane est élevé, en étant au moins égal à 4 et de préférence compris entre 4 et 10, en formant ainsi des complexes polynucléaires obtenus avec au moins 4 ions calcium pour un groupe NH_2 du chitosane et 1 mole de Lipide.

20 13. Procédé de stabilisation de dispersion aqueuse de Liposomes, caractérisé en ce qu'on forme un complexe ternaire stable par addition dans ladite suspension de liposomes de chitosane et d'ions calcium de manière à former un complexe ternaire stable de chitosane, de calcium avec les Lipides constituant les Liposomes.

25 14. Dispersion aqueuse de liposomes stabilisés, caractérisée en ce que le Lipide se présente sous forme d'un complexe ternaire stable de Lipides chitosane et calcium.

1/4

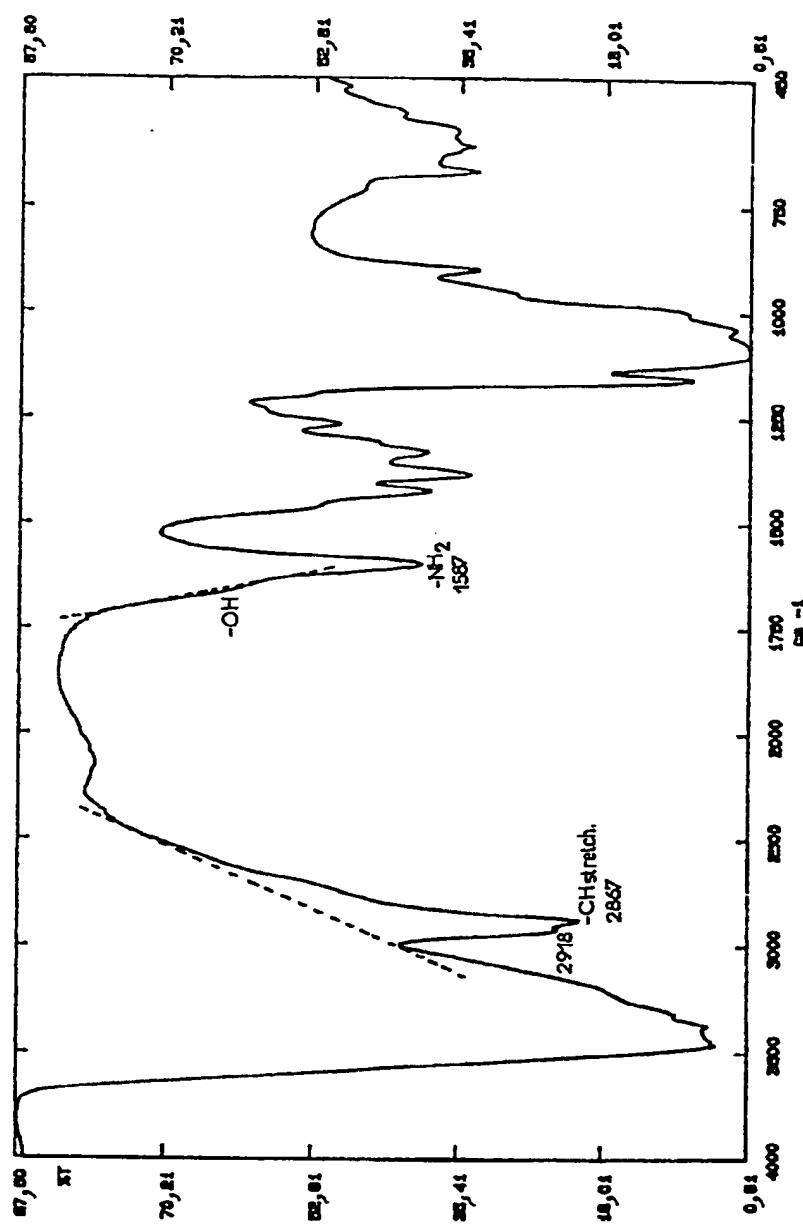


Fig.1. Spectre I.R. du chitosane totalement désacétylé

2/4

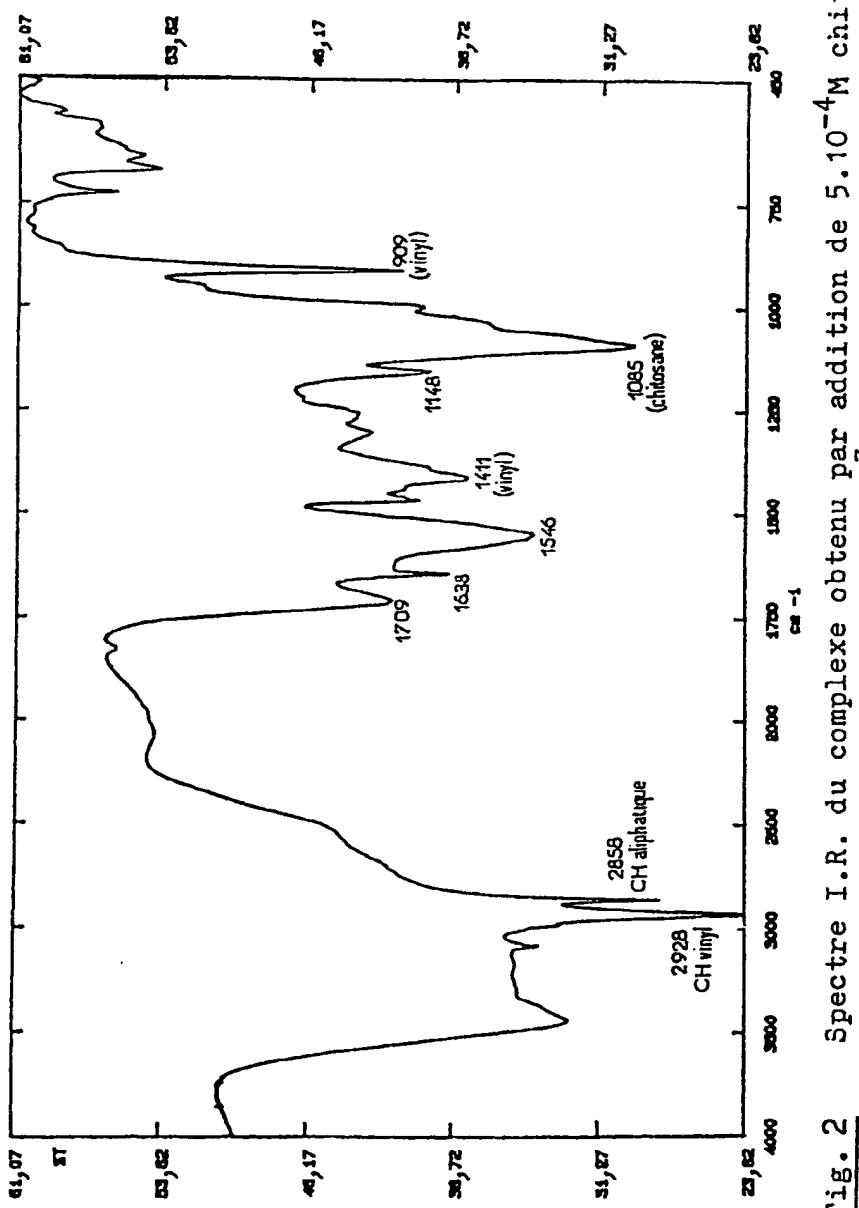
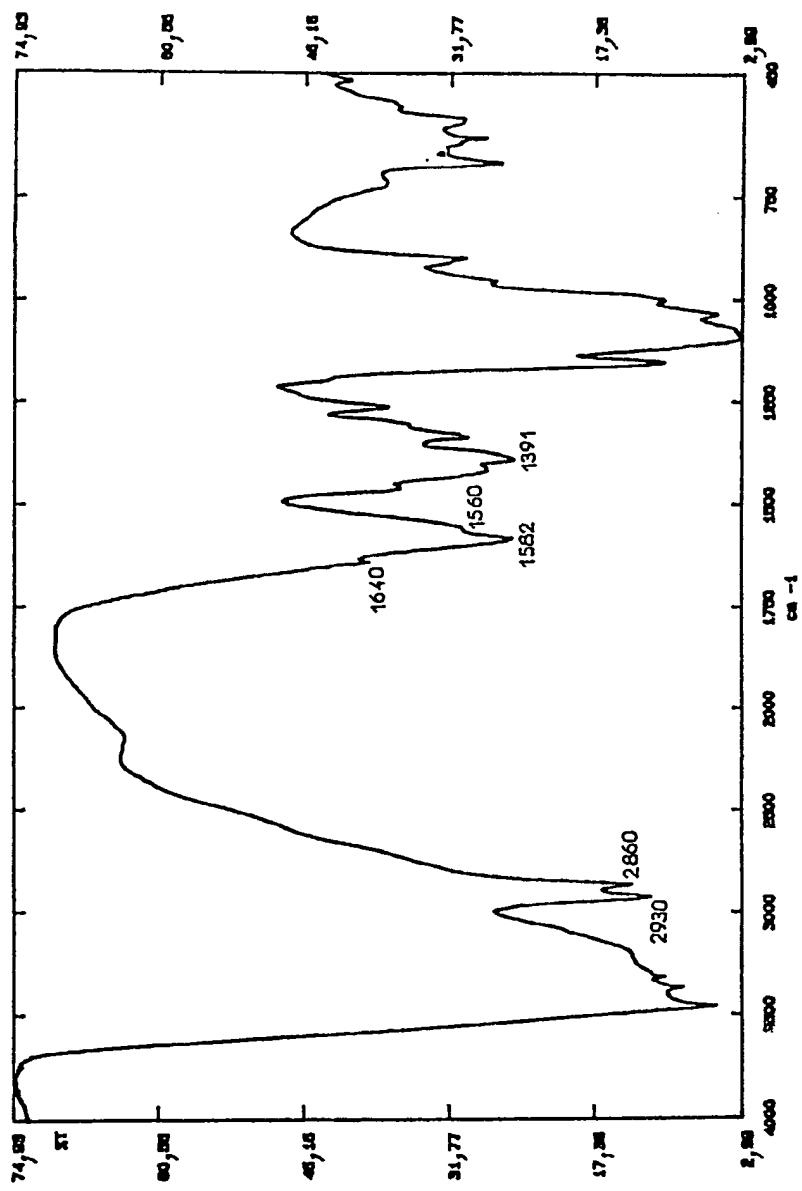


Fig. 2 Spectre I.R. du complexe obtenu par addition de $5 \cdot 10^{-4}$ M chitosane dans une solution contenant $1 \cdot 10^{-3}$ M undécylate de Na et $1 \cdot 10^{-3}$ M CaCl_2

3/4



4/4

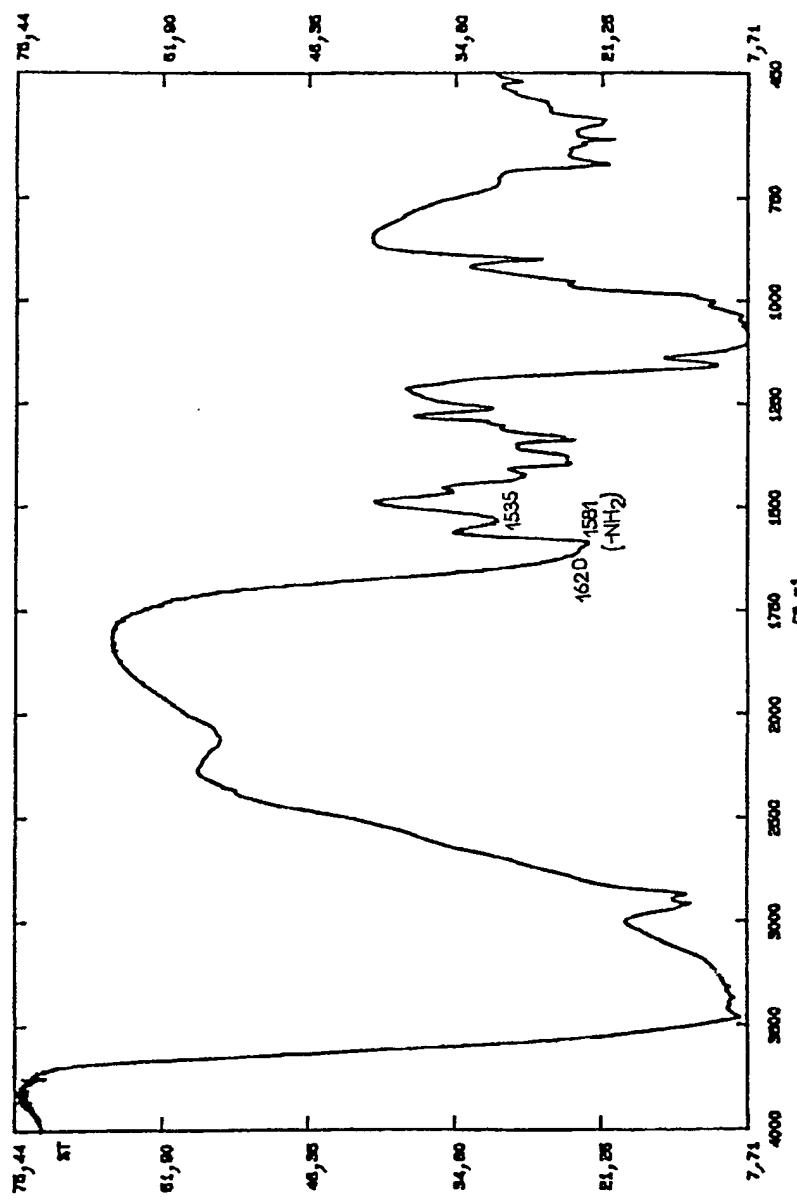


Fig. 4 Spectre I.R. d'un film de chitosane après 9 jours de trempage dans une suspension de liposomes de lécithine (10mg/ml) contenant 1.10^{-3} M CaCl_2

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2667072

N° d'enregistrement
nationalINSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9011746
FA 447364

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	US-A-4 223 023 (FURDA) * Colonne 1, lignes 39-68; colonnes 3,4, example 3 * ---	1,3,6,8
A	EP-A-0 183 556 (IHARA CHEMICAL IND. CO.) * Page 37, ligne 5 - page 38, ligne 25 * ---	1,3,6, 13,14
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 9, no. 74 (C-273)[1797], 3 avril 1985, page 161; & JP-A-59 210 013 (AJINOMOTO) 28-11-1984 * Abrégé * -----	1,3,6, 13,14
DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)		
		C 08 B A 61 K
Date d'achèvement de la recherche 05-06-1991		Examinateur MAZET J.-F.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		